

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

Prodn. of organ-specific antitumour agents - comprising anticancer drug
coupled with tumour-specific antibody
Patent Assignee: (THEU/) THEURER K
Author (Inventor): THEURER K
Number of Patents: 001
Pat nt Family:

CC Number	Kind	Date	Week
DE 1617886	A	710128	8741 (Basic)

Priority Data (CC No Date): DE 67T33356 (670306)
Abstract (Basic): DE 1617886

Prodn. of organ-specific antitumour agents is effected by: (a) incubating human or animal leucocytes with tumour antigens to convert the leucocytes into a pre-morbid state, and opt. isolating RNA from the leucocytes; (b) producing immunoglobulins by immunising animals or cancer patients with the leucocytes or RNA, or by adding the leucocytes or RNA to a culture of other lymphatic cells or a suitable synthetic cell-free system; (c) contacting the immunoglobulins with tissue extracts of the organ normally attacked by the tumour to be treated; (d) pptg. non-binding immunoglobulins with tumour extracts, and cleaving the resulting immune complexes to isolate an antibody fragment and an antigen fragment; and (e) coupling the antibody fragment with an anticancer or cytolytic drug. @(13pp Dwg.No.0/0)@

⑭
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND
DEUTSCHES  PATENTAMT
⑮

Int. Cl.:

A 61 k

①
②
③
④
⑤
⑥
⑦
⑧
⑨
⑩
⑪
⑫
⑬
⑭
⑮
⑯
⑰
⑱
⑲
⑳
㉑
㉒
㉓
㉔
㉕
㉖
㉗
㉘
㉙
㉚
㉛
㉜
㉝
㉞
㉟
㊱
㊲
㊳
㊴
㊵
㊶
㊷
㊸
㊹
㊺
㊻
㊼
㊽
㊾
㊿
1
11
2-5

cited in the
process of
Your Ref. 88 10 4984.7
Enz-5(EPO) Div. II

Deutsche Kl.: 30 h, 2/04

⑩
⑪
⑫
⑬
⑭
⑮
⑯
⑰
⑱
⑲
⑳
㉑
㉒
㉓
㉔
㉕
㉖
㉗
㉘
㉙
㉚
㉛
㉜
㉝
㉞
㉟
㊱
㊲
㊳
㊴
㊵
㊶
㊷
㊸
㊹
㊺
㊻
㊼
㊽
㊾
㊿
Offenlegungsschrift 1617 886

Aktenzeichen: P 16 17 886.2 (T 33356)

Anmeldetag: 6. März 1967

Offenlegungstag: 28. Januar 1971

Ausstellungspriorität: —

⑮
⑯
⑰
⑱
⑲
⑳
㉑
㉒
㉓
㉔
㉕
㉖
㉗
㉘
㉙
㉚
㉛
㉜
㉝
㉞
㉟
㊱
㊲
㊳
㊴
㊵
㊶
㊷
㊸
㊹
㊺
㊻
㊼
㊽
㊾
㊿
Unionspriorität

Datum: —

Land: —

Aktenzeichen: —

⑭
⑮
⑯
⑰
⑱
⑲
⑳
㉑
㉒
㉓
㉔
㉕
㉖
㉗
㉘
㉙
㉚
㉛
㉜
㉝
㉞
㉟
㊱
㊲
㊳
㊴
㊵
㊶
㊷
㊸
㊹
㊺
㊻
㊼
㊽
㊾
㊿
Bezeichnung:

Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln mit selektivem Tropismus gegen Krebs und bestimmte Organe

⑮
⑯
⑰
⑱
⑲
⑳
㉑
㉒
㉓
㉔
㉕
㉖
㉗
㉘
㉙
㉚
㉛
㉜
㉝
㉞
㉟
㊱
㊲
㊳
㊴
㊵
㊶
㊷
㊸
㊹
㊺
㊻
㊼
㊽
㊾
㊿
Zusatz zu: —

Ausscheidung aus: —

Anmelder: Theurer, Dr. med. Karl, 7000 Stuttgart

Vertreter: —

⑮
⑯
⑰
⑱
⑲
⑳
㉑
㉒
㉓
㉔
㉕
㉖
㉗
㉘
㉙
㉚
㉛
㉜
㉝
㉞
㉟
㊱
㊲
㊳
㊴
㊵
㊶
㊷
㊸
㊹
㊺
㊻
㊼
㊽
㊾
㊿
Als Erfinder benannt: Erfinder ist der Anmelder

Benachrichtigung gemäß Art. 7 § 1 Abs. 2 Nr. 1 d. Ges. v. 4. 9. 1967 (BGBl. I S. 960): 31. 10. 1969

T 1617886

A

4

Patentansprüche

- 1.) Verfahren zur Herstellung organspezifischer und gegen Krebs
- (A) spezifischer Arzneimittel, dadurch gekennzeichnet, daß man A.) die in bekannter Weise aus Blutkonserven oder frischem menschlichen oder tierischen Blut isolierten Leukozyten, insbesondere Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen mit Tumor-Antigenen inkubiert und durch bekannte physikalische und bzw. oder chemische Methoden in praeparativem Zustand versetzt, konserviert oder aus den Zellen nach bekannten Methoden die Ribonucleinsäuren isoliert und konserviert,
- (B) diese Präparate nach bekannten Methoden über Mitteltiere oder in Kulturen von antikörperbildenden Zellen bzw. den daraus hergestellten, oder auch künstlich erzeugten zellfreien Systemen, zur Gewinnung von Antikörpergemischungen benutzt und bzw. oder
- (C) entsprechende Antikörper aus Blut oder Körperflüssigkeiten der entsprechenden Krebs-Patienten nach Verbehandlung mit den nach Arbeitsgang A) hergestelltem Präparaten gewinnt, dann

000000/1000

1

Dr. med. Karl Theurer

diese nach Arbeitsgang B und C gewonnenen Antikörperglobuline nach bekannten Methoden einzeln oder als Mischung nach ~~ebenfalls~~ ~~bekannten Verfahren~~ an Organextrakten aus den Geweben des normalen Mutterbodens der Geschwulst abkättigt und

die sich nicht bindenden Antikörperglobuline mit Tumorextrakten präzipitiert, dieses Präzipitat nach ~~bekannten~~ Methoden isoliert und in ihre beiden Bestandteile dissoziiert, die Antikörper und Antigene, bzw. Haptene, chemisch oder fermentativ in Fragmente mit erhaltenem Tropis^{mus} aufspaltet und

an diese Fragmente durch bekannte chemische Verfahren krebewirksame bzw. zytolytische Medikamente ankoppelt, wobei die Verfahrensschritte A; A und B; A und C; D und E, sowie D, E und F und E und F für sich allein ausgeführt werden können.

2.) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß anstatt der Tumor-Extrakte, Organ-Extrakte oder Organ-Antigene als Ausgangsstoffe benutzt werden und im Arbeitsschritt D) andere Organarten, als diejenigen des Ausgangsproduktes verwendet werden.

3.) Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl gesundheitsfördernde, wie-schädigende, als auch unmittelbar und mittelbar pharmakologisch wirkende chemische Moleküle an die organotropen bzw. tumortropen Schleppersubstanzen angekoppelt werden.

4.) Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß Moleküle verwendet werden, die durch elektromagnetische Strahlen oder durch andere Stoffe biologisch aktiv werden.

**Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln mit
selektiven Tropismus gegen Krebs und bestimmte
Organe.**

Bei Spontan-Tumoren reicht die körpereigene immunologische Tumorabwehr durch Antikörperglobuline mengenmäßig nicht aus. Die Antikörper können einen selektiven Tropismus zu den Tumorzellen besitzen, ohne daß sie diese schädigen. Die immunologische Krebstherapie muß deshalb sowohl die tumorspezifische Antikörperbildung, als auch die zellschädigende Wirkung der Antikörper auf Tumorzellen verstärken.

Die aktive Immunisierung des Tumor-Patienten mit Tumor-Antigenen, insbesondere aus dem körpereigenen Tumor, kann die Antikörperbildung nur wenig beeinflussen, weil sich im Verlauf der Tumorkrankheit eine immunologische Toleranz gegen diese Tumor-Antigene ausbildet. Sofern organspezifische Antigene mitverwendet werden besteht bei dieser Art der Behandlung dann die Gefahr für eine Auto sensibilisierung gegen das Organewebe des Mutterbodens der Geschwulst.

Erfindungsgemäß kann nun die Antikörperbildung gegen Tumore eingeleitet oder aktiviert werden, wenn man Messenger-Ribonucleinsäuren aus sensibilisierten lymphatischen Zellelementen des Blutes und der Körperflüssigkeiten, wie Makrophagen, monocytoide Elemente, kleine Lymphocyten und spindelförmige Zellen (Histiozyten) anstatt des Antigens auf den Patienten überträgt. Nach dieser Methode ist auch die Einleitung einer Antikörperbildung in Mittler-Tieren sowie in Gewebekulturen von lymphatischen Geweben und in den aus solchen Geweben hergestellten zellfreien Synthesesystemen in vitro möglich. Dieses Verfahren der Induktion der Antikörperbildung durch Messenger-RNS und der Gewinnung von Antikörpern in vitro wurde von JACHERTS beschrieben in Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 132, 112-133 (1966).

009885/1985

- 2 -

sowie in den dort unter Nr. 5, 11, 12 und 13 angegebenen diesbezüglichen weiteren Veröffentlichungen. Dieses Verfahren wurde jedoch bisher nicht in der vorliegenden Weise zur Erzeugung von Messenger-RNS und Antikörpern gegen Tumoren und normale Organe verwendet. Das Verfahren läßt sich nämlich auch auf Organ-Extrakte bzw. Organ-Antigene als Ausgangsstoffe übertragen.

Bei vorliegendem Verfahren ist die besondere Methode der aktiven Immunisierung durch RNS und der Antikörpergewinnung ein Bestandteil, der als Verfahrensschritt A bezeichnet wird.

(A)

Die Gewinnung von Tumor-Antigenen und geeigneten Tumor-Extrakten wie auch von Organ-Antigenen und Organ-Extrakten erfolgt nach bekannten Verfahren, z.B. nach DEP-Anmeldung T 33 036 IVa/Joh; dem DEP 1 090 821; nach POTTER, APPELLA und GEISSER: J. Mol. Biol. (1965) u.a.. Zur Erzeugung der M-RNS in Zellen werden bei vorliegendem Verfahren auf bekannte Weise, z.B. durch Schwerkrafttrennung, spontane Sedimentation, Elektrophorese und Siebung aus Blutkonserven die leukozytären Blutzellen, insbesondere die antikörperbildenden Zellen isoliert und im natürlichen Milieu des Blutplasmas, gegebenenfalls unter Zusatz von Antibiotika und bzw. oder Chemotherapeutika oder aber in einem geeigneten Gewebekulturmedium, z.B. Hanck's-Lösung + 10 % Kälberserum sowie Zusatz von Antibiotika und bzw. oder Chemotherapeutika (vergl. D. JACHERTS: Z. Med. Mikrobiol. u. Immunol. 152, 1 - 19 (1966), gegebenenfalls unter mechanischer Bewegung und Durchlüftung gezüchtet. Der Tumor-Extrakt bzw. die Tumor-Antigene werden entsprechend diesem Verfahren in Verdünnungen zugesetzt, z.B. von 10^{-4} bis 10^{-12} g der Tumor- bzw. Organ-Trockensubstanzen oder den entsprechenden Konzentrationen von Frischextrakten pro ml des Gewebekulturmediums. Nach einer Bebrütungszeit von mehreren Stunden bis Tagen werden die Leukozyten mit UV-Licht bestrahlt (vergl. JACHERTS: Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 152, 262 bis 272 (1966), oder aber durch andere physikalische Methoden, z.B. durch kurze Erwärmung auf 40°C , Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen, oder durch chemische Einwirkung von radioaktiv wirkenden Substanzen geschädigt.

Nach Eintreten des prämorbidem Stadiums, das am beginnenden Absterben von Zellen der Kultur zu erkennen ist, werden die Zellen durch vorsichtiges Abschleudern isoliert und mehrmals in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und gefriergetrocknet. Es ist auch möglich, nach KIRBY: Progress in nucleic acid research and molecular biology, ed. by DAVIDSON and COWN. New York and London: "Academic Press," die RNS zu präparieren und anschliessend durch Gefrier Trocknung zu konservieren.

- B) Die so gewonnenen lymphatischen Zellen bzw. RNS werden nun in Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-9} g Trockensubstanz pro ml physiologischer Kochsalzlösung als Suspension bzw. Lösung gegebenenfalls wiederholt im Arbeitsgang B Mittler-Tieren injiziert oder in Gewebekulturen unter Verwendung anderer lymphatischer Zellen oder gegebenenfalls künstlich zusammengesetzter zellfreier Synthesysteme zur Erzeugung von Antikörpern verwendet.

- C) Die Anregung der Antikörperbildung und Gewinnung von Antikörpern von Krebs-Patienten entspricht dem Arbeitsgang C des vorliegenden Verfahrens. Auch hier erfolgen die Injektionen in Abständen von Stunden bis einigen Tagen.

- D) Die nach Arbeitsgang B) und C) gewonnenen Antikörperglobuline können nun im Arbeitsgang D einzeln oder als Mischung nach ebenfalls bekannten Verfahren an Organ-Extrakten aus den Geweben des normalen Mutterbodens der Geschwulst, oder den entsprechenden homologen oder heterologen Organ-Extrakten oder Homogenaten abgesättigt werden. Es eignet sich dazu das Verfahren der Adsorption mittels Säulenchromatographie, wie auch bekannte immunologische Verfahren der Präzipitation. Dieser Arbeitsschritt ist besonders wichtig, wenn zur Gewinnung der Antikörper bzw. der M-RNS keine isolierten Tumor-Antigene, sondern Tumor-Totalextrakte verwendet wurden, die noch organspezifische Faktoren des normalen Gewebes enthalten. Der nicht präzipitierte Teil des Antikörpers ist wahrscheinlich tumorspezifisch.

- E) Eine weitere Reinigung kann im Arbeitsgang E) durch Absättigung an dem entsprechenden Tumor-Extrakt erfolgen. Das durch Antigen-Anti-

körperbildung zustandekommende Präzipitat wird nach bekannt n Methoden isoliert und gewaschen und in seine beiden Bestandt il dissoziiert, wobei die Antikörper und Antigene bzw. Haptene zurückgewonnen werden können, (vergl. z.B. GRAMLICH: Naturwissenschaft n 49 (1962), 451.) Die Antikörper-Globuline können z.B. aber auch nach Dissoziation vom Antigen durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat gefüllt, von der überstehenden Antigenlösung getrennt und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen werden. Aus d r überstehenden Antigenlösung werden, z.B. gegebenenfalls nach bekannten Verfahren, durch Gel-Filtration oder Dialyse die Antigene und Hapte isoliert. Die isolierten Antigene können dann beim Verfahrensschritt A) und B) oder aber auch direkt zur aktiven Immunisierung und erneuten Antikörpergewinnung verwendet werden.

(F) Die isolierten tumorspezifischen Antikörper werden nun im Arbeits-schritt: F) nach bekannten Verfahren durch milde Reduktion, z.B. mit β -Merkaptoethanol, durch Sprengung der Disulfidbrücken in Bruchstücke gespalten (vergl. POTTER, APPELLA und GEISSER, J. N 1. Biol. (1965), 14, 361 bis 372, Dreesman: Proc. nat. Acad. Sci. 54 (1965) 822-830.) Eine Frakturierung ist auch durch andere chemische Methoden, z.B. durch Anwendung von Salzlösungen und Erwärmung, wie auch durch chemische Hydrolyse (vergl. DEB ...) und durch fermentative Spaltung, z.B. mit Papain (vergl. KRONVALL: V x. Sang. 10: 303-313 (1965) möglich. Der Tropismus zum Antigen muß dabei für einen Teil der Bruchstücke erhalten sein. Nach bekannten chemischen Methoden werden nun an diese Bruchstücke krebewirksame Arzneimittel gebunden. Diese müssen gegebenenfalls vor der Ankopplung chemisch aktiviert werden. So werden z.B. an die freien Sulfhydrylgruppen der Antikörperbruchstücke Schwefel-Loos-Derivate, die vorher am Schwefelatom reduziert worden sind, durch milde Oxidationsmittel angekoppelt. Es können jedoch auch andere bekannte chemische Methoden der Ankopplung, je nach Verwendung eines bestimmten Arzneimittels verwendet werden, wie z.B. die Diasotierung, Alkylierung, d. Oxaz 1 n-Verfahren, u.a.. Gegebenenfalls v rden nun di nicht zur Reakti n gekommen n Antikörper-Globuline erneut durch Aussalzung gefüllt und di im Überstand vorhandenen angekoppelten k njugierten

8

Moleküle z.B. durch Dialyse oder Gel-Filtration isoliert und nach bekannten Verfahren konserviert.

Auch die isolierten Tumor-Antigene können einen Tropismus zum gleichartigen Tumor besitzen. Sie eignen sich dann ebenfalls als Vehikel für Arzneimittel, mit denen sie nach bekannten chemischen Methoden zusammengekoppelt werden können. Eine vorherige Abtrennung und Isolierung der chemisch reaktiven Gruppe des Moleküls, die für den Tropismus verantwortlich ist, kann auch hier erfolgen, bevor die chemische Verbindung mit dem tumorwirksamen Arzneimittel stattfindet.

Die Vorteile und Anwendungsmöglichkeiten tumorspezifischer Arzneimittel liegen in der selektiven Anreicherung der Arzneimittel am gewünschten Ort der Wirkung. Gegen Krebs werden z.B. die bekannten zytotoxischen bzw. -statischen Substanzen, oder aber auch zytolytische Substanzen, wie z.B. Histaminabkömmlinge, das Puryl-Histamin, das Epsilon-Puryl-Lysin, oder auch das Dipuryl-Aethylendiamin verwendet, ebenso ist eine Übertragung von Nucleinsäuren oder internen Repressoren, sowie von Eiwirkkörpern möglich. Durch den gezielten Transport wird eine vorzeitige Inaktivierung der wirksamen Substanzen vermieden. Die Vergrößerung des Arznei-Moleküls durch Ankopplung an ein Antikörper- oder Antigen-Fragment verringert die Möglichkeit der Resorption durch andere Körperzellen, die keine Rezeptoren für das Antikörpervehikel besitzen. Gefährliche Nebenwirkungen entfallen.

Wegen der Individual- und Tumorspezifität und der Vielzahl der möglichen Arzneimittel und chemischen Ankopplungsmethoden bieten sich für vorliegendes Verfahren umfangreiche Anwendungsmöglichkeiten. Auch ist eine getrennte Anwendung einzelner Verfahrensschritte möglich, so z.B. von Verfahrensschritt A; A und B; A und C; D und E; D, E und F, sowie auch E und F. Als Ausgangsprodukt bzw. Antigen für die Herstellung von Präparaten kann jede Art von Neoplasma dienen, einschliesslich der sogenannten Blutkreise.

Das erfundungsgemäße Verfahren lässt sich auf die Herstellung von organischen Arzneimitteln übertragen. Dort werden anstatt der

Tumor-Extrakte bzw. -Antigene Organextrakte, oder isolierte Organ-Antigene verwendet. Im Verfahrensschritt D) erfolgt die Absättigung der Antikörper-Globuline an einem Extrakt aus einer anderen Organart, z.B. bei der Isolierung von Antikörpern gegen Großhirn an Extrakt aus Kleinhirn, Zwischenhirn oder Rückenmark; bei solchen gegen Zwischenhirn an Rückenmark oder Großhirn; bei Antikörpern gegen Niere an Leber oder Herz; bei solchen gegen Herz an Nieren Leber oder Milz; bei solchen aus Lymphdrüsen an Thymus; bei denen gegen Thymus, an Milz usw. Die Gewinnung von Organ-Antikörpern nach dem erfindungsgemäßen Verfahren des Arbeitsschrittes A) ist auch ~~hier~~, ebenso wie die Kombination der weiteren Verarbeitung zu organotropen Arzneimitteln, neuartig. Hier bestehen besonders viele Anwendungsmöglichkeiten durch die Ankopplung der verschiedenartigsten Arzneimitteln und chemischer Moleküle. Diese können biologisch sowohl unmittelbar, als auch indirekt wirken, indem sie z.B. durch elektromagnetische Strahlen, die von einem besonderen Sender abgestrahlt werden, angeregt werden. Auf diese Weise ist die drahtlose Übermittlung von elektrischen Impulsen, z.B. auf das Herz oder bestimmte Gehirnteile möglich, desgleichen auch die Verstärkung von lokalen bioelektrischen Vorgängen und ihre spezifische Ableitung. Am Ort der Wirkung können nicht unmittelbar biologisch aktive Moleküle durch andere Moleküle aktiviert werden.

Beispiel 1:

- Es sollen tumorspezifische S-Leste zur Behandlung eines Bronchial-Carcinoms hergestellt werden. Die Herstellung gliedert sich in 6
- (A) Arbeitsgänge. Im Arbeitsgang A) werden die Tumor-Antigene sowie gr B-molekulare RNS zur Antikörpererzeugung gewonnen. Dazu wird der Tumor nach der chirurgischen Entnahme in kleinere Partikel zerschnitten. Diese werden in physiologischer Kochsalzlösung gespült, dann in verflüssigtem Stickstoff schlagartig gefroren und in tiefgekühlten Mühlen pulverisiert, dann lyophilisiert, anschliessend durch die wasserfreie Skuredampf-Hydrolyse im Vakuum nach DBP 1 9 821 aufgeschlüsselt und als haltbares Dauerpräparat steril unter Luftabschluss aufbewahrt. Nun werden aus frischen Blutnerven von menschlichem Blut oder auch aus frischem tierischen Blut durch Sedimentation und bzw. oder andere

10

bekannte Verfahren die Leukozyten von den roten Blutzellen und den Thrombozyten abgetrennt und im entsprechenden Blutserum nach bekannten Verfahren, gegebenenfalls unter Zusatz von Antibiotika und bzw. oder Chemotherapeutika, in Art einer Gewebekultur gezüchtet. Es können hierzu auch andere geeignete Nährmedien verwendet werden, wie z.B. Hanck's-Lösung mit Zusatz von 10 % Kalberserum und eine Kombination von Antibiotika. Innerhalb einer Stunde nach Anlegung der Leukozytenkultur wird dieser ein wässriger verdünnter Extrakt aus dem Dauerpräparat des Tumors in einer Konzentration von 10^{-6} g Trockensubstanz pro ml des Nährmediums zugesetzt. Um die Lipide des Tumor-Totalextraktes in Lösung zu bringen, werden 0,01 mg Laurylnatriumsulfat pro ml mitverwendet. Es können auch frische Tumor-Extrakte oder Homogenate benutzt werden.

Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen bei 37°C , werden die Zellen der Kultur 10 Sek. lang mit UV-Licht aus einer Quecksilber-Niederdrucklampe mit 8 Watt und UV-Filter im Abstand von 13 cm bestrahlt. Nach etwa 15 Min. werden die Zellen aus der Kultur genommen, dann mehrmals in PBS-Lösung gewaschen und gefriergetrocknet.

- (B) Im Arbeitsgang B) werden nun Antikörper-Globuline gewonnen über Mitteltiere oder aus in-vitro-Kulturen von antikörperbildenden Zellen bzw. von geeigneten zellfreien Systemen. Die Methode entspricht einer aktiven Immunisierung, bei der anstatt des Antigens die nach Arbeitsgang A) erhaltenen Präparate in einer Verdünnung von 10^{-6} g Trockensubstanz pro ml physiologischer Kochsalzlösung verwendet werden. Beim Makroorganismus erfolgt die Injektion parenteral, dreimal in Abständen von 1, 2 und 3 Tagen. Die Antikörperproduktion kann dabei unter Verwendung des Tumor-Antigens nach bekannten Methoden der Gel-Präzipitation überwacht werden, so daß nach Erreichen einer ausreichenden Konzentration die Antikörper-Globuline nach bekannten Verfahren aus dem Blut oder den Körperflüssigkeiten bzw. den Nährmedien gewonnen und z.B. durch Gel-Filtration an Sephadex G 200 bzw. durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat angereichert werden. Das Fällungsprodukt der Ammoniumsulfatlösung wird zentrifugiert und, nachdem der Überstand beseitigt ist, mit physiol. NaCl gewaschen.



- (C) Im Arbeitsgang C) wird im Tumor-Patienten die Antikörperbildung angeregt und verstärkt. Dabei werden in gleicher Weise, wie bei Mitteltieren, die aus Arbeitsgang A) gewonnenen Präparate parenteral injiziert. Die Gewinnung der Antikörper-Globuline erfolgt wie im Arbeitsgang B).
- (D) Im Arbeitsgang D) werden nun die nach Arbeitsgang B) und C) gewonnenen Antikörper-Globuline im Verhältnis 1:1 zusammengesetzt und an Organ-Extrakten aus gesunden Geweben des normalen Mutterbodens der Geschwulst abgesättigt. Sofern es nicht möglich ist, aus dem Operations-Präparat gesunde Gewebe zu konservieren, können zur Absättigung auch tierische Organextrakte verwendet werden. Das nach bekannten Methoden gewonnene Präzipitat enthält dann die organ- und gegebenenfalls art- und individualspezifischen Faktoren der Antikörper-Globuline.
- (E) Die nicht zur Reaktion gekommenen Antikörper sind sowohl gegen die Tumor-Antigene, als auch gegen exogene Antigene gerichtet. Um letztere zu beseitigen, erfolgt im Arbeitsgang E) die Präzipitation der bisher nicht abgesättigten und sich in Lösung befindlichen Antikörper an dem nach Arbeitsgang A) gewonnenen Tumor-Extrakt. Auch hier werden die fettlöslichen Bestandteile dieses Extraktes mitverwendet, indem diese durch Zusatz von Lauryl-Natriumsulfat der 10% Konzentration emulgiert werden. Das Präzipitat wird nun in üblicher Weise isoliert, gewaschen und in seine Bestandteile dissoziiert. Die Antikörper-Globuline werden durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat gefällt und absentrifugiert. Das übrigbleibende Tumor-Antigen kann dann gegebenenfalls später bei einer Wiederholung des Arbeitsganges A) verwendet oder aber zur aktiven Immunisierung von Mitteltieren, bzw. zur Herstellung von organotropen Arzneimitteln benutzt werden.
- (F) Im Arbeitsgang F) werden nun die isolierten Antikörper in 0-Mercaptoethanol vorsichtig reduziert. Dazu wird eine Lösung von 0,3 M-Mercaptoethanol, 0,7 M Guanidin-HCl, 0,5 M TRIS-HCl - Puffer (pH 8,2) verwendet, bei einem Gehalt von 1 bis 2 % der Antikörper-Globuline.

12

Nach einer Einwirkungszeit von 1/2 Stunde bei 37°C werden nun 1 M S-Lost der Lösung zugesetzt und diese eine weitere Stunde bei 30°C gehalten. Nun wird auf 10°C abgekühlt und 0,7 M-Methylenblau als schwaches Oxidationsmittel zugesetzt. Nach einer Einwirkungszeit von 1/2 Stunde wird die Lösung für 24 Stunden gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert und dann lyophilisiert. Vorher können die nicht gespaltenen Antikörper-Globuline durch Absättigung mit Ammoniumsulfat ausgefällt, abzentrifugiert und beseitigt werden. Der Überstand wird dann erneut gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert. Das fertige Präparat kann in frischem Zustand therapeutisch verwendet werden oder es wird lyophilisiert und vor der Anwendung in einem Lösungsmittel aufgelöst.

Beispiel 2:

Es sollen selektive Arzneimittel gegen ein Muskel-Sarkom hergestellt werden. Die Arbeitsschritte A und C entsprechen dem Beispiel 1. Der Arbeitsschritt B entfällt. Im Arbeitsschritt D erfolgt die Präzipitation der vom Patienten gewonnenen Antikörper mit einem frischen zellfreien Extrakt aus Muskelgewebe vom Rind, der unmittelbar nach der Schlachtung hergestellt wurde. Das Präzipitat wird zentrifugiert und der Überstand mit dem Tumor-Extrakt inkubiert. Das sich bildende Präzipitat wird gewaschen und bei 37°C für 16 Stunden im Verhältnis 100:1 mit Mercuripapain als Enzym in einer Lösung von 0,01 M Cystein, 0,002 M EDTA, 0,15 M NaCl, 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0. Das verdaut^{verdaute} Präzipitat wird an Sephadex-G-100 in einer Säule von 4,5 x 35 cm nach Equilibrierung der Säulen mit 0,005 M Phosphatpuffer von pH 8,0 in einer Rate von 20 ml pro Stunde vom verwendeten Papain getrennt. Die Bruchstücke aus Antikörpern und Antigenen bzw. Haptenen, werden nun durch Diazotierung an Triäthylmelamin (TEM) gekuppelt. Das nicht gebundene TEM wird durch Gel-Filtration entfernt.

Beispiel 3:

Es soll ein selektiv auf das Gehirn einwirkendes Arzneimittel hergestellt werden. Dazu wird im Arbeitsschritt A aus einem chirurgischen Operationspräparat menschliches Gehirn gewonnen und zur Erzeugung von

antikörperbildenden RNS verwendet. Im Arbeitsgang B werden damit Antikörper vom Pferd gewonnen. Diese werden im Arbeitsgang D an einen Extrakt aus Rückenmark vom Rind abgesättigt. Im Arbeitsgang E erfolgt die Präzipitation der nicht zur Reaktion gekommenen organspezifischen Antikörper mit dem Extrakt aus menschlichem Gehirn. Das Präzipitat wird durch 2-%ige Glykokollösung nach OLITZKI und FRANKEL dissoziiert (vergl. NATURE: 126, 723 (1930) und Proc. Soc. exp. Biol. n. Med. 28, 492 (1931)) und die Globuline durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat gefällt und zentrifugiert. Aus dem Überstand werden die Antigene gewonnen und zur Diagnostik des Tropismus der später erhaltenen Präparate sowie des Sensibilisierungsgrades des Patienten gegen Gehirn verwendet. Die Antikörper werden fermentativ in Bruchstücke gespalten und durch Ionenaustauscherchromatographie in DEAE-Zellulose (vergl. FRANK J. clin. Invest. 39: 1933 (1960)) getrennt. Durch Gel-Präzipitation mit dem Organ-Antigen wird der organotrope Anteil festgestellt und dieser durch Diazotierung an das Arzneimittel gekoppelt.
